

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-319068

(43) 公開日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

A 6 1 L 27/00

A 6 1 L 27/00

C

15/44

15/03

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/00

B

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平10-129048

(22) 出願日

平成10年(1998) 5月12日

(71) 出願人 000138082

株式会社メニコン

愛知県名古屋市中区葵 3 丁目 21 番 19 号

(72) 発明者 黒柳 能光

神奈川県座間市小松原一丁目 5137 番地 1

(72) 発明者 杉山 章寿

愛知県春日井市高森台五丁目 1 番地 10 株

式会社メニコン総合研究所内

(72) 発明者 柳川 博昭

愛知県春日井市高森台五丁目 1 番地 10 株

式会社メニコン総合研究所内

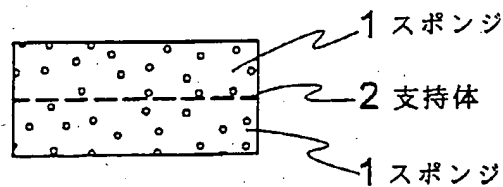
(74) 代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 人工皮膚用基材およびその製法

(57) 【要約】

【課題】 効率よく強度が付与された支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジからなる人工皮膚用基材を提供すること。

【解決手段】 支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジからなる人工皮膚用基材、およびその製法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジからなる人工皮膚用基材。

【請求項2】 支持体と前記スポンジが組み合わされた請求項1記載の基材。

【請求項3】 細胞外基質がコラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸またはそれらの混合物である請求項1記載の基材。

【請求項4】 支持体が合成高分子製または天然高分子製の編物または織布、または不織布である請求項1記載の基材。

【請求項5】 培養皮膚用基材または創傷被覆材である請求項1記載の基材。

【請求項6】 支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジを組み合わせることからなる請求項1記載の基材の製法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジからなる人工皮膚用基材およびその製法に関する。さらに詳しくは培養皮膚用基材または創傷被覆材として用いられる前記基材およびその製法に関する。

【0002】

【従来の技術】アテロコラーゲンなどの細胞外基質を用いて作製したスポンジ状マトリックスを培養皮膚の基材として皮膚欠損創へ適用するなど（黒柳能光、熱傷、「細胞組み込み型人工皮膚」第23巻、第1号、1997年3月、9～27頁参照）、細胞外基質からなる培養皮膚用基材および創傷被覆材が従来から使用されている。しかしながら、前記基材は脆弱で強度が低いため、ピンセットなどで前記基材をつまむと自重で落下したり、創面に適用する際に欠損するなど扱いづらく、また従来行なわれている移植皮膚片の固定で使用するステープル（ホッチキス）で前記基材を止めるとくずれるため、前記基材を創面に固定することはできず、非常に使いにくいものであった。また、前記基材の上にガーゼまたは被覆材をそえて皮膚欠損創面まで運び適用する試みがなされているが、前記のガーゼや被覆材はそえているだけなので、適用した基材は創面に固定されず、ずれてしまうなどの問題があった。

【0003】また、とくに前記基材を培養皮膚用基材として用いたときには、細胞培養の際に用いた血清を適用前に除く洗浄操作、凍結保存後に解凍して適用する際には凍結保存液を除く洗浄操作などを行なう必要があるが、基材が脆弱であるが故に破損することが多かった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らはこのような状況に鑑み、前記問題点を改善すべく鋭意研究を重ねた結果、支持体と細胞外基質成分から作製されたスポン

ジを組み合わせることにより、強度が付与され取り扱いやすくなった基材が提供されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジからなる人工皮膚用基材（請求項1）に関する。

【0006】また、本発明は支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジを組み合わせることからなる請求項1記載の基材の製法（請求項6）に関する。

【0007】前記基材は、好ましくは、支持体と前記スポンジが組み合わされた請求項1記載の基材（請求項2）、細胞外基質がコラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸またはそれらの混合物である請求項1記載の基材（請求項3）、支持体が合成高分子製または天然高分子製の編物または織布、または不織布である請求項1記載の基材（請求項4）および培養皮膚用基材または創傷被覆材である請求項1記載の基材（請求項5）である。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明における「細胞外基質成分」とは、主に動植物からの分離・精製手法によりえられるものであって、かつ生体内で消化（分解・吸収）されるものを意味し、具体的にはコラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、ポリグリコール酸、コンドロイチン硫酸、アルギン酸、アガロースおよびそれらの混合物などを含む。また創傷被覆材および培養皮膚用基材では創傷面周辺の線維芽細胞の活性化を促し、創傷治癒を促進することからコラーゲンが好ましい。とくに培養皮膚用基材では、さらに容易に細胞を接着させるためにコラーゲンまたはコラーゲンとゼラチン混合物が好ましい。表皮細胞、線維芽細胞の移動を促進するばあいには、ヒアルロン酸またはヒアルロン酸をコラーゲンおよび／またはコラーゲンとゼラチン混合物に混合することが好ましい。前記混合物の組成と混合比は用途により適宜選択しうる。

【0009】前記の分離・精製手法としては、当業者が通常用いる、動植物組織から酵素処理して抽出するなどの手法があげられる。

【0010】本発明における「細胞外基質成分から作製されたスポンジ」とは、前記細胞外基質成分から作製し、スポンジ状の多孔構造を有するものであればどんなものでもよい。培養皮膚用基材としては、細胞ができるだけ均一にスポンジ全体に浸透し、接着できるようにするためには、空孔の径が10～500μmであることが好ましく、30～300μm程度であることがより好ましい。

【0011】創傷被覆材としては、創面からの浸出液を十分に吸収し留置できる空孔を有することが望ましく、そのため、空孔の径が10μm～3mmであることが好ましく、50～1000μm程度であることがより

好ましい。空孔の径が3mmを超えると基材が脆弱となり、基材の分解も急速に起こりうるので、強度と分解速度との関係で空孔の大きさを調整する。

【0012】前記スポンジの作製方法としては、たとえば、前記細胞外基質成分を適当な溶媒（たとえば水）に溶解し、ゲル化したのちに凍結乾燥し、要すれば架橋を行なう方法、適当な溶媒（たとえば水）に架橋剤を加え、成型したのちに、洗浄乾燥する方法などがあげられる。

【0013】以下に細胞外基質成分から作製されたスポンジがコラーゲンスポンジであるばあいについて、作製手順を具体的に説明する。

【0014】コラーゲンスポンジは、酸可溶性コラーゲンを用いるばあい、酸性に調製したコラーゲン溶液をホモジナイザーを用いてホモジナイズすることにより十分に気泡を含ませたものを容器に流し込み、アンモニアガス雰囲気中に静置してゲル化させたのち凍結乾燥を行ない、ついで紫外線照射または架橋剤によって分子間架橋を導入することにより作製することができる。

【0015】前記コラーゲン溶液は、ウシ真皮などからえられたコラーゲンから調製して、pHを好ましくは2～4に調整し、濃度が0.2～3w/v%、好ましくは0.5～2w/v%とすることによりえられる。ゲル化はアンモニアなどのガス雰囲気下で必要に応じて数分～2時間程度行ない、水洗し、こののち、凍結乾燥を行なう。

【0016】架橋に用いる紫外線（UV）の主波長は250～270nmのものが好ましく、紫外線量は500～12000mWsec/cm<sup>2</sup>、好ましくは1000～5000mWsec/cm<sup>2</sup>の線量を照射するとよい。本発明に用いられる架橋剤の例としてはたとえば、グルタルアルデヒド、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリグリセロールポリグリシジルエーテル、グリセロールポリグリシジルエーテル、ヘキサメチレンジイソシアネートなどがあげられる。

【0017】前記スポンジの厚さは、用途により適宜選択すればよいが、熱傷などによる皮膚欠損に適用するばあいには、表皮層および真皮層に至る欠損創を被覆する必要があるため、好ましくは0.5～3mm、より好ましくは1～2mm、深い褥瘡に適用するばあいには好ましくは1～30mmである。

【0018】前記スポンジの形状および大きさは適宜選択すればよいが薄板状、板状、棒状、紡錘状、両側凸レンズ状、球状などがあげられる。

【0019】本発明における「支持体」とは、生体内で消化されない（非吸収性）構造物を意味し、たとえば、ナイロン、ポリエステルまたはシリコンなどの合成高分子、絹、木綿または麻などの天然高分子からできている編物または織布、または不織布などが包含されるが、好ましくは前記編物または織布である。前記編物または織

布とは、当該人工皮膚用基材の強度を増して、基材が消化される状態においても組織と癒着しにくい程度の目を持つ編物または織布を意味するが、前記基準を満たす編物または織布、または不織布であれば、本発明に用いることができる。このことから、メッシュの大きさとしては、3<sup>1/2</sup>～400メッシュでよい。好ましくは、細胞を通過させ難い200～400メッシュ、さらに好ましくは、体液を通過、蒸散させ難く創面に体液を温存させる閉鎖包帯法（オクルーシブ）の状態に近い250～400メッシュである。前記メッシュとは、Tyler（テイラー）により定義されたものを意味する。

【0020】前記不織布とは短繊維とからみ合わせ、層化させた布状物を意味し、たとえば、和紙のような形態のものをいう。

【0021】前記支持体の厚みは、用途により適宜選択すればよいが、十分に基材を支持する強度を与え、取扱いやすくなるためには、好ましくは0.01～1mmである。

【0022】本発明の基材とは、支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジ（状物質）からなるものを意味する。前記スポンジと前記支持体との組み合わせの形態は、好ましくは前記支持体の少なくとも片面で前記スポンジが接触している形態であり、適用した際支持体が動かず、皮膚欠損創面へのせ、その上にガーゼをのせてとめたばあい、上方（前記創面からより遠方）のスポンジがクッションのような役割を果たすので、より好ましくは前記支持体の両面に前記スポンジが接触している形態（サンドイッチ状の形態）である（図1および2参照）。本発明の基材の形状および大きさは、適用するものにしたい適宜選択すればよい。

【0023】本発明の基材の作製方法としては、前記のように調製した細胞外基質成分溶液上に支持体をのせ、要すればさらにその上に前記溶液を加えたのち、ゲル化し、凍結乾燥を行ない、要すれば架橋を行なう方法などをあげることができる。

【0024】本発明にしたがった前記基材の製法は、好ましくは、細胞外基質成分からなる液体を支持体と前記支持体の少なくとも片面で接触させて凍結乾燥することによって支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジを組み合わせることからなり、より好ましくは、細胞外基質成分溶液上に支持体をのせてゲル化および凍結乾燥を行なうことによって支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジを組み合わせることからなり、とくに好ましくは、細胞外基質成分溶液上に支持体をのせ、その上に前記溶液を加えたのちに、ゲル化および凍結乾燥を行なうことによって支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジを組み合わせることからなる。前記細胞外基質成分溶液とは、細胞外基質成分と、前記細胞外基質成分を溶解する溶媒からなり、好ましくは、細胞外基質成分水溶液を意味する。

【0025】本発明の基材は人工皮膚以外のいかなる用途にも用いられうるが、人工皮膚用、好ましくは培養皮膚用基材または創傷被覆材として用いられる。

【0026】以下に本発明を実施例をあげてさらに詳細に説明するが、本発明はもとよりこの実施例に限定されるものではない。

【0027】

【実施例】比較例1

コラーゲンスポンジの作製（従来技術）

1gの粉末コラーゲン（（株）高研製）をpH3の塩酸酸性水溶液100mlに溶解した。えられたコラーゲン溶液60mlをホモジナイザー（（株）日本精機製作所製）で1分間ホモジナイズして十分に気泡を含ませたのち、19cm×10cm、高さ2.5cmのポリスチレン製の容器（商品名：スチロール角型ケースNO. 15、（株）サンブラテック製）に入れ、水平を維持してアンモニアガスの雰囲気下にて中和し（25℃、120分）ゲル化させた。えられたコラーゲングルを約-80℃で凍結したのち、真空凍結乾燥機（ラブコンコ社製）に移して-30℃より段階的に室温まで昇温し、30時間かけて凍結乾燥しコラーゲンスポンジをえた。えられたコラーゲンスポンジに紫外線（3600mW/cm<sup>2</sup> UV、15分）を表裏に照射して架橋した。えられた架橋コラーゲンスポンジの形状は約18×9.5×0.18cmであった。

【0028】また、ダルベッコ変法イーグル最小必須培地（ギブコ社製）溶液50mlを前記架橋コラーゲンスポンジに加えたばあいの前記スポンジの引裂き強度は、約0.2ニュートン/mmであり、取扱いはガーゼを添えて扱わなければならない非常に脆弱で取扱いが困難であった。なお、引裂き強度はインストロン万能材料試験機（モデル4301、インストロン社製）を用いて、2×3cmの長方形試験片の短辺中央にて長辺に平行に2cmの長さの切り込みを入れ、この両端を引張ることで求めた。

【0029】実施例1

コラーゲンスポンジと支持体からなる基材の作製

1gの粉末コラーゲン（（株）高研製）をpH3の塩酸酸性水溶液100mlに溶解した。えられたコラーゲン溶液の60mlをホモジナイザー（（株）日本精機製作所製）で1分間ホモジナイズして十分に気泡を含ませたのち、このコラーゲン溶液の30mlを19cm×10cm、高さ2.5cmのポリスチレン製の容器（商品名：スチロール角型ケースNO. 15、（株）サンブラテック製）に入れ、水平を維持し、前記容器と同形状の300メッシュのナイロン製織布を前記コラーゲン溶液の上に静かにのせた。さらに残りのコラーゲン溶液30mlを前記ナイロン製織布の上に静かに注入した。コラーゲン溶液+ナイロン製織布+コラーゲン溶液が入った容器の水平を保ち、アンモニアガスの雰囲気下で中和し

（25℃、120分）ゲル化させた。えられたコラーゲングルについて比較例1と同様に凍結乾燥を行ない、コラーゲンスポンジをえた。えられたコラーゲンスポンジに紫外線（3600mW/cm<sup>2</sup> UV、15分）を表裏に照射し架橋してえられた架橋コラーゲンスポンジの形状は約18×9.5×0.19cmであった（図3（a）～（d）および図4（a）～（d）参照）。

【0030】また、ダルベッコ変法イーグル最小必須培地（ギブコ製）溶液50mlを前記架橋コラーゲンスポンジに加えたばあいの前記スポンジは引裂き強度試験が困難なほどの強度を有しており、ガーゼなどを添えることなく、そのまま困難なく取扱うことができた。なお、引裂き強度試験は比較例1と同様に行なった。

【0031】試験例1

実施例1と同様にしてえられた基材の一方のスポンジ上に10%牛胎児血清（以下、FBS）含有ダルベッコ変法イーグル最小必須培地（以下、DMEM+10%FBS、ギブコ社製）中に懸濁した培養ウサギ線維芽細胞を1×10<sup>4</sup>細胞/cm<sup>2</sup>の密度で播種したのちCO<sub>2</sub> 5%、35℃のインキュベーター中で7日間培養し、培養真皮を作製した。培地を除去し、これを凍結保存液（10%グリセロール含有DMEM+10%FBS）に入れ-152℃の冷凍庫内で保存した。3カ月間凍結保存したのち、解凍して凍結保存液を除去し、ハanks液30mlで2回洗浄して動物実験に使用した。ウサギの背部に直径7cmの円を描き前層皮膚を切除した。切除後、皮膚欠損創の直径は9cmと広がった。この皮膚欠損創に解凍した前記基材（同種培養真皮）を直径9cmに切って適用し創周辺をナイロン6.0縫合糸（協和時計工業（株）製）により縫合し、その上にバイオクレーシブ（ポリウレタンフィルム製創傷被覆材）を適用し、さらに直径9cmの滅菌パットをのせて、前記と同様に創周辺と縫合固定し伸縮性包帯で圧迫固定した。1週間後に、包帯交換を行ない創面を観察して、再度、新しい基材を適用し、さらに2週間（3週目）に創面を観察した。

【0032】コラーゲンスポンジ内にはナイロンメッシュが組み込まれているため解凍後の洗浄操作は非常に容易であり、また移植操作が容易であった。とくに創周辺との縫合固定が可能であった。3週目において良好な肉芽組織が形成され、創周辺からの表皮化も観察された。新生組織はナイロンメッシュに食い込んでおらず容易に創面からナイロンメッシュを除去することができた。

【0033】

【発明の効果】本発明によれば、支持体と細胞外基質成分から作製されたスポンジを組み合わせることにより、これらからなる基材の強度が向上され取扱いやすくなった人工皮膚用基材を提供することが可能となる。さらに、本発明の基材のスポンジ上に細胞を播種することにより培養皮膚が大量に生産でき、凍結保存が可能で、要時解

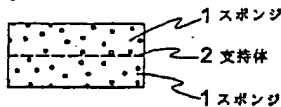
凍し使用できる。えられた培養皮膚は解凍後の凍結保存液を除去するための洗浄操作性、輸送性および移植操作性が向上されており、また創面をオクルーシブに近い状態にできるので、創面の組織修復が促進されることになり、適当な時期に新生組織に悪影響を与えることなく創面から支持体を除去することができる。本発明の基材は、培養皮膚用基材と同様、創傷被覆材としても好適に用いられる。

【図面の簡単な説明】

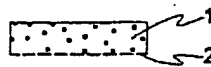
【図1】本発明の基材の一実施例の説明図であって、スポンジとスポンジの間に支持体をはさまった状態で支持体とスポンジが組み合されている基材の断面図を示す図である。

【図2】本発明の基材の別の実施例の説明図であって、支持体の片面でスポンジが接触している状態で支持

【図1】



【図2】



体とスポンジが組み合されている基材の断面を示す図である。

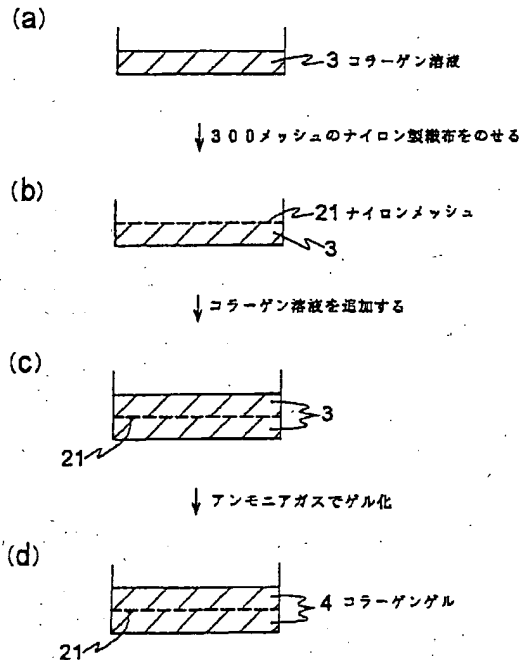
【図3】本発明の基材の一作製手順（前半）を示す説明図である。

【図4】本発明の基材の一作製手順（後半）を示す説明図である。

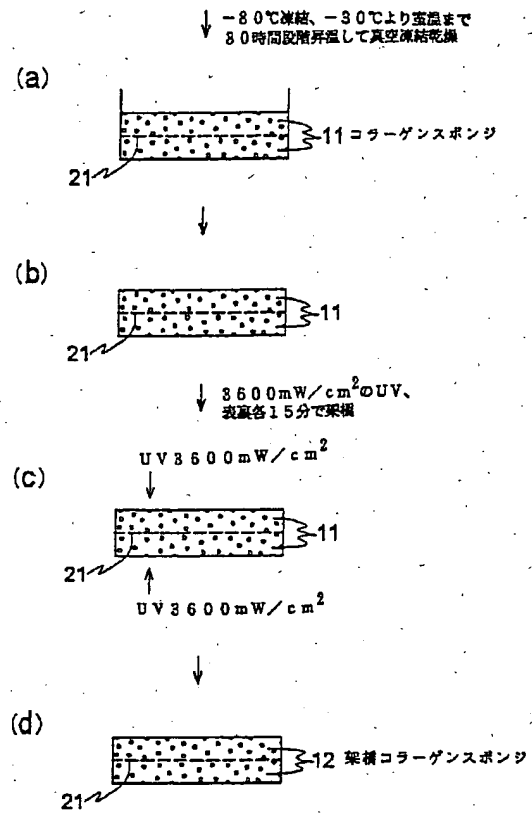
【符号の説明】

- 1 スポンジ
- 2 支持体
- 3 コラーゲン溶液
- 4 コラーゲングル
- 11 コラーゲンスポンジ
- 12 架橋コラーゲンスポンジ
- 21 ナイロンメッシュ

【図3】



【図4】



**WEST**

Generate Collection

Print

L5: Entry 1 of 4

File: JPAB

Nov 24, 1999

PUB-NO: JP411319068A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 11319068 A

TITLE: BASE MATERIAL FOR ARTIFICIAL SKIN AND PRODUCTION THEREOF

PUBN-DATE: November 24, 1999

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

KUROYANAGI, TAKAMITSU

SUGIYAMA, AKIHISA

YANAGAWA, HIROAKI

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

MENICON CO LTD

APPL-NO: JP10129048

APPL-DATE: May 12, 1998

INT-CL (IPC): A61 L 27/00; A61 L 15/44; C12 N 5/10

## ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To impart strength while facilitating handling by constituting a base material of a support and a sponge formed from an extracellular matrix component.

SOLUTION: A base material for an artificial skin consists of a support 2 and a sponge (like substance) 1 formed from an extracellular matrix component. The combined form of the sponge 1 and the support 2 is set so that the sponge 1 is pref. brought into contact with at least the single surface of the support 2 and more pref. brought into contact with both surfaces thereof. The base material is produced by placing the support 2 on a prepared extracellular matrix component soln. and further adding the soln. to the surface of the support if necessary and gelling the soln. to lyophilize the same and crosslinking the extracellular matrix component layer if necessary. Herein, as the extracellular matrix component, collagen, gelatin, hyaluroinic acid or a mixture of them are used. As the support 2, a knitted fabric, a fabric or a nonwoven fabric made of a synthetic polymer such as nylon or polyester or a natural polymer such as silk or cotton is used and, pref., the knitted fabric or the fabric is used.

COPYRIGHT: (C)1999, JPO